

# DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE POLIFENOLES EXTRACTABLES Y NO EXTRACTABLES DE CACAOS EN POLVO



## UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I  
DEL MEDI NATURAL

TRABAJO FINAL DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

ALUMNO:

Rafael González Prado

TUTORES:

Édgar Pérez Esteve  
María Jesús Lerma García

TUTOR EXPERIMENTAL:

Damián Valverde García

Curso académico 2017-2018, Convocatoria 7ª julio 2018 (151) Valencia



Escuela Técnica Superior  
de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural

# **DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE POLIFENOLES EXTRACTABLES Y NO EXTRACTABLES DE CACAOS EN POLVO**

## **Resumen**

El cacao en polvo es la fracción obtenida tras la molienda de la torta de cacao. Éste puede ser sometido a un tratamiento de alcalinización que le confiere diferentes propiedades nutricionales y organolépticas. La alcalinización, además de modificar estas propiedades, tiene efecto en el contenido de diferentes compuestos funcionales presentes en el cacao, como los polifenoles. Estos compuestos pueden dividirse en dos grupos: polifenoles extractables o compuestos que se solubilizan en solventes acuosos y/u orgánicos, y polifenoles no extractables que permanecen en el residuo obtenido tras la extracción. Hasta la fecha, la mayoría de estudios se han focalizado en la caracterización de los polifenoles extractables, desconociéndose el efecto que tiene la procedencia de la materia prima y la alcalinización en la fracción no extractable.

El presente trabajo tiene por objetivo la determinación del contenido de polifenoles extractables y no extractables mediante técnicas espectrocolorimétricas (Folin-Ciocalteu y DPPH) y HPLC en una colección de cacaos en polvo procedentes de tres orígenes distintos (Costa de Marfil, Gana e Indonesia) y sometidos a diferentes grados de alcalinización (natural, alcalino suave, alcalino medio, alcalino fuerte y alcalino superfuerte).

Los resultados obtenidos demuestran que la procedencia de la muestra condiciona en gran medida el contenido en polifenoles totales, capacidad antioxidante y contenido en catequina y epicatequina en la fracción extractable, siendo la muestra procedente de Ghana la que presenta un mayor contenido en polifenoles. La alcalinización provocó una disminución estadísticamente significativa de cada uno de estos cuatro parámetros, siendo en general la disminución proporcional al grado de alcalinización. La cuantificación de catequina y epicatequina en la fracción no extractable permitió concluir que el contenido de ambos analitos fue muy inferior al de la fracción extractable. Esto apunta a que, o bien en el cacao en polvo la mayoría de los polifenoles son extractables o a que el método de hidrólisis seguido no es el adecuado. Por tanto, para poder asegurar la cantidad de catequina y epicatequina presente en la fracción no extractable será necesario utilizar métodos de hidrólisis de polifenoles no extractables alternativos, como por ejemplo los enzimáticos.

## **Palabras clave**

Polifenoles extractables, polifenoles no extractables, cacao en polvo, origen, alcalinización.

## **Abstract**

Cocoa powder is the fraction obtained after grinding the cocoa cake. This can be subjected to an alkalizing treatment that gives it different nutritional and organoleptic properties. Alkalization, besides of modifying these properties, has an effect on the content of different functional compounds present in cocoa, such as polyphenols. These compounds can be divided into two groups: compounds that can be solubilized in aqueous and/or organic solvents (extractable polyphenols) and compounds that remain in the obtained residue after the extraction (non-extractable polyphenols). Until now, most studies have focused on the characterization of extractable polyphenols. Thus, it is unknown the effect of the origin of the raw material and the alkalization in the non-extractable fraction.

The objective of this work is to determine the content of extractable and non-extractable polyphenols by spectro-colorimetric techniques (Folin-Ciocalteu and DPPH) and HPLC in a collection of cocoa powder from three different origins (Ivory Coast, Ghana and Indonesia) and subjected to different degrees of alkalization (natural, low alkalized, medium alkalized, strong alkalized and super strong alkalized).

Results show that the origin of the sample greatly influences the content of total polyphenols, antioxidant capacity and content of catechin and epicatechin in the extractable fraction, being the sample from Ghana the one with the highest polyphenol content. The alkalization caused a statistically significant decrease of each of these four parameters, being in general the decrease proportional to the degree of alkalization. The quantification of catechin and epicatechin in the non-extractable fraction allowed concluding that the content of both analytes was much lower than that of the extractable fraction. This suggests that either in cocoa powder most of the polyphenols are extractable or that the followed hydrolysis method is not adequate. Therefore, in order to ensure the amount of catechin and epicatechin present in the non-extractable fraction, it will be necessary to use alternative non-extractable polyphenol hydrolysis methods, such as for example enzymatic ones.

## **Key words**

Extractable polyphenols, non-extractable polyphenols, cocoa powder, origin, alkalization.

**Alumno:** D. Rafael González Prado.

**Tutores académicos:** Édgar Pérez Esteve, María Jesús Lerma García.

**Tutor experimental:** Damián Valverde García.

Departamento de tecnología de alimentos. Universidad Politécnica de Valencia, julio de 2018.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	6
<b>1.1 Cacao</b> .....	6
<b>1.2 Procesado del cacao</b> .....	6
<b>1.2.1 Procesado primario</b> .....	6
<b>1.2.2 Procesado secundario</b> .....	7
<b>1.3 Funcionalidad del cacao</b> .....	9
<b>1.4 Compuestos fenólicos en el cacao</b> .....	9
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	11
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	12
<b>3.1 Materia prima y reactivos</b> .....	12
<b>3.2 Extracción y análisis de polifenoles extractables</b> .....	12
<b>3.2.1 Obtención del extracto</b> .....	12
<b>3.2.2 Determinación del contenido en polifenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu</b> .....	12
<b>3.2.3 Determinación de la capacidad antioxidante por el método DPPH</b> .....	13
<b>3.2.4 Cuantificación de catequina y epicatequina mediante RP-HPLC</b> .....	13
<b>3.3 Extracción y análisis de polifenoles no extractables</b> .....	14
<b>3.3.1 Obtención del extracto</b> .....	14
<b>3.3.2 Cuantificación de catequina y epicatequina mediante RP-HPLC</b> .....	14
<b>3.4 Análisis estadístico</b> .....	14
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	15
<b>4.1 Polifenoles extractables</b> .....	15
<b>4.1.1 Determinación del contenido en polifenoles totales</b> .....	15
<b>4.1.2 Determinación de la capacidad antioxidante</b> .....	16
<b>4.1.3 Determinación del contenido de catequina</b> .....	18
<b>4.1.4 Determinación del contenido de epicatequina</b> .....	19
<b>4.2 Polifenoles no extractables</b> .....	20
<b>4.2.1 Determinación del contenido de catequina</b> .....	20
<b>4.2.2 Determinación del contenido de epicatequina</b> .....	21
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	22
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	24

## ÍNDICE DE FIGURAS

- **Figura 1.** Diagrama de flujo del procesado del cacao. Página 8.
- **Figura 2.** Esquema con las principales familias de polifenoles. Página 11.
- **Figura 3.** Equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) empleado. Página 14.
- **Figura 4.** Contenido en polifenoles totales (media  $\pm$  sd, mg GAE/100g cacao) de la fracción extractable de cacaos en polvo de orígenes Costa de Marfil (CM), Ghana (GA) e Indonesia (IN) naturales (N) y con diferentes grados de alcalinización: alcalino suave (AS), alcalino medio (AM), alcalino fuerte (AF) y alcalino super fuerte (ASF). Página 16.
- **Figura 5.** Valores de capacidad antioxidante (media  $\pm$  sd, mg equivalentes de trolox/100g cacao) de la fracción extractable de cacaos en polvo de orígenes Costa de Marfil (CM), Ghana (GA) e Indonesia (IN) naturales (N) y con diferentes grados de alcalinización: alcalino suave (AS), alcalino medio (AM), alcalino fuerte (AF) y alcalino super fuerte (ASF). Página 17.
- **Figura 6.** Contenido de catequina (media  $\pm$  sd, mg de catequina/ 100g de cacao) de la fracción extractable de cacaos en polvo de orígenes Costa de Marfil (CM), Ghana (GA) e Indonesia (IN) naturales (N) y con diferentes grados de alcalinización: alcalino suave (AS), alcalino medio (AM), alcalino fuerte (AF) y alcalino super fuerte (ASF). Página 18.
- **Figura 7.** Contenido de epicatequina (media  $\pm$  sd, mg de epicatequina/ 100g de cacao) de la fracción extractable de cacaos en polvo de orígenes Costa de Marfil (CM), Ghana (GA) e Indonesia (IN) naturales (N) y con diferentes grados de alcalinización: alcalino suave (AS), alcalino medio (AM), alcalino fuerte (AF) y alcalino super fuerte (ASF). Página 20.
- **Figura 8.** Contenido de catequina (media  $\pm$  sd, mg de epicatequina/ 100g de cacao) de la fracción no extractable de cacaos en polvo de orígenes Costa de Marfil (CM), Ghana (GA) e Indonesia (IN) naturales (N) y con diferentes grados de alcalinización: alcalino suave (AS), alcalino medio (AM), alcalino fuerte (AF) y alcalino super fuerte (ASF). Página 21.
- **Figura 9.** Valores del contenido de epicatequina (media  $\pm$  sd) de la fracción no extractable de cacaos en polvo de orígenes Costa de Marfil (CM), Ghana (GA) e Indonesia (IN) naturales (N) y con diferentes grados de alcalinización: alcalino suave (AS), alcalino medio (AM), alcalino fuerte (AF) y alcalino super fuerte (ASF). Página 22.

## NOMENCLATURAS Y ABREVIATURAS

- **ACN** acetonitrilo
- **AF** cacao alcalino fuerte
- **AM** cacao alcalino medio
- **ANOVA** análisis de la varianza
- **AS** cacao alcalino suave
- **ASF** cacao alcalino super fuerte
- **CM** Costa de Marfil
- **DPPH** 1,1-difenil-2-picrilhidrazil
- **g** gramo
- **Ga** Ghana
- **GAE** equivalentes de ácido gálico
- **h** hora
- **HCl** ácido clorhídrico
- **HPLC** cromatografía líquida de alta resolución
- **H<sub>2</sub>O** agua
- **In** Indonesia
- **L** litro
- **LSD** mínima diferencia significativa
- **M** molar
- **mg** miligramos
- **min** minuto
- **mL** mililitros
- **mM** milimolar
- **mm i.d.** milímetros de diámetro interior
- **N** cacao natural
- **NaOH** hidróxido de sodio
- **nm** nanómetro
- **RP** fase reversa
- **rpm** revoluciones por minuto
- **sd** desviación estándar
- **UV** ultravioleta
- **VIS** visible
- **µL** microlitro
- **µm** micrómetros

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Cacao

Como [Minifie, B. \(2012\)](#) indica en su libro, “cacao” es un término que puede englobar varias definiciones. Con este término se hace referencia generalmente a las habas de cacao fermentadas y secas, pero si se define desde un punto de vista botánico, el cacao se refiere tanto al árbol como a los frutos que genera.

Del cacao se obtienen varios productos que pueden ser empleados como materia prima para la elaboración de una gran diversidad de productos, siendo los tres principales productos obtenidos el licor de cacao, la manteca de cacao (que se emplea para la elaboración del chocolate) y el cacao en polvo ([Perea-Villamil et al., 2009](#)).

Según el [Real Decreto 822/1990](#), la manteca de cacao es la materia grasa obtenida a partir de los granos del cacao tras ser sometidos a un proceso de presión hidráulica. Por otro lado, el cacao en polvo se define como el producto derivado del cacao obtenido tras transformar el grano en una torta mediante prensado y posteriormente mediante trituración mecánica. Por licor de cacao se entiende el producto compuesto por partículas de cacao en suspensión en manteca de cacao ([ICCO, 2018](#)).

La industria Europea consume más de un millón de toneladas de granos de cacao para molturar ([ECA, 2018](#)), siendo los Países Bajos la principal potencia elaboradora, así como el principal exportador mundial de cacao en polvo ([ECA, 2018](#)).

## 1.2 Procesado del cacao

### 1.2.1 Procesado primario

El cacao sufre distintos tratamientos antes de pasar a la venta como materia prima o producto. Los factores de calidad y sabor del cacao dependen en gran medida de la forma en la que ha sido realizado este procesado. Las primeras etapas a las que se somete el fruto del cacao son la recolección, la fermentación y el secado ([Giacometti et al., 2015](#)).

1. **Recolección:** como indica la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura ([FAO, 2018](#)), la recolección es el proceso mediante el cual se recogen las vainas del cacao cuando están en el punto más adecuado de madurez. A continuación, se abren las vainas con el fin de obtener las semillas de cacao.
2. **Fermentación:** Una vez extraídas las semillas de las vainas, se procede a la fermentación de las mismas, con la finalidad de eliminar la cubierta que recubre la semilla, matar el germen y darle un buen sabor al cacao ([FAO, 2018](#)). Mediante este proceso se genera una muerte del embrión, evitando la germinación de la semilla ([Jinap, 1994](#)).

Durante la fermentación la presencia de bacterias ácido-lácticas, acetobacterias y de levaduras, llevan a cabo una gran cantidad de reacciones que varían la composición y características del cacao. Entre los cambios más significativos se produce una modificación de la cantidad de aminoácidos, se reducen azúcares, cambia el pH y el contenido en polifenoles ([Giacometti et al., 2015](#)). La

fermentación es un proceso muy importante ya que si se realiza inadecuadamente, da lugar a la aparición de sabores desagradables, puede afectar al contenido microbiano y puede reducir significativamente el contenido en polifenoles, lo que sería fatal para sus cualidades organolépticas (Giacometti *et al.*, 2015).

- 3. Secado:** Tras ser fermentado, el cacao se somete a un proceso final de secado ya sea al sol de forma natural o de forma artificial. Durante el mismo se realiza una disminución del contenido en humedad hasta valores del 7-8% para conseguir una mejora en la conservación (Zahouli *et al.*, 2010). Este proceso es muy importante, ya que durante éste, al igual que ocurre en la fermentación, la cantidad de polifenoles se ve afectada, lo que afecta a las características organolépticas del cacao, produciéndose cacaos con una menor astringencia (Hansen *et al.*, 1998; Nazaruddin *et al.*, 2006).

### 1.2.2 Procesado secundario

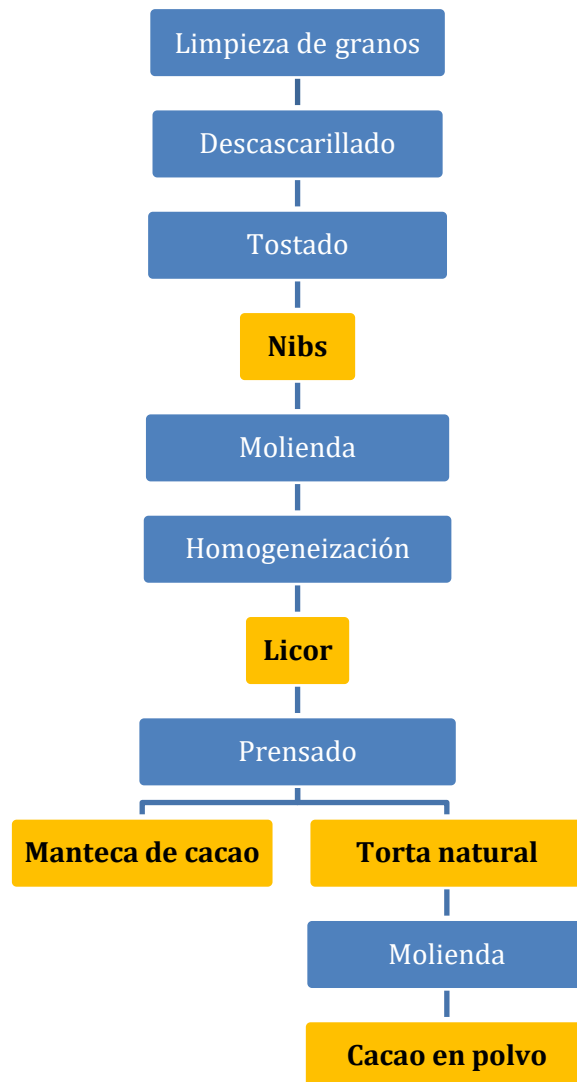
Tras la obtención de un haba de cacao fermentada y seca, las habas son procesadas industrialmente para su posterior uso como materia prima. Estos pasos se resumen a continuación (López D'Sola *et al.*, 2012).

- 1. Limpieza:** El primer paso es realizar una limpieza de los granos de cacao para eliminar todo tipo de material extraño, como polvo, piedras y arena.
- 2. Descascarillado:** Se realiza el descascarillado de las habas, dejando de este modo sólo la semilla de cacao.
- 3. Tostado:** Estas semillas se someten a un proceso de tostado. Una vez tostadas, se obtiene el primer producto, los nibs o virutas de cacao tostados (ICCO, 2018).
- 4. Molienda:** A continuación, los nibs se someten a un proceso de molturación, con el cual se obtiene licor de cacao.
- 5. Homogeneización:** Con este proceso se obtiene licor de cacao listo para ser empleado como producto.
- 6. Prensado:** El licor de cacao se somete a un proceso de prensado, dando lugar a dos productos: la manteca del cacao, que se extrae al someter el licor de cacao a presión, y la torta de cacao, que es la masa sólida resultante, a partir de la cual se va a obtener el cacao en polvo.
- 7. Molienda:** Este proceso da lugar al cacao en polvo tras moler y triturar la torta de cacao.
- 8. Alcalinización:** Una vez obtenido el cacao en polvo, éste puede someterse a un proceso de alcalinización, si bien este proceso puede llevarse a cabo directamente sobre torta de cacao, o durante pasos previos del proceso de elaboración. La importancia del proceso de alcalinización radica principalmente en el producto final, ya que sirve para desarrollar el sabor y el color del cacao. Por lo general, la alcalinización reduce tanto la acidez del cacao como su astringencia. Esta disminución en la astringencia es debida a que durante el tratamiento alcalino existe una gran polimerización de los flavonoides. La alcalinización se lleva a cabo normalmente mediante la adición de carbonato sódico o de potasio a altas temperaturas y presiones controladas. Se pueden



aplicar diferentes niveles de alcalinización dependiendo del tipo y la cantidad de alcali empleado, el tiempo de reacción, y la temperatura. Los cacaos alcalinos suaves tienen un color marrón claro algo más oscuro que la torta natural de cacao, y un sabor menos astringente y menos ácido que la torta natural, mientras que los cacaos fuertemente alcalinizados tienen un color muy oscuro y un sabor mucho más fuerte que los alcalinos suaves (ICCO, 2018; De Zaan, 2013; Kostic, 1997).

En la **Figura 1** se muestra un esquema del proceso de obtención de los productos del cacao.



**Figura 1.** Diagrama de flujo del procesado del cacao. Los productos obtenidos figuran en color naranja.

Teniendo en cuenta el proceso anteriormente explicado, son 5 los productos que se obtienen del haba del cacao, y que pueden por tanto ser empleados como materia prima:

1. **Nibs:** los nibs de cacao se obtienen tras realizar el descascarillado y tostado del haba (ICCO, 2018).
2. **Licor de cacao:** el licor de cacao es el segundo producto que se obtiene, tras la molturación de los nibs.

3. **Manteca de cacao:** la manteca de cacao es uno de los productos que se obtiene tras prensar el licor. Se emplea principalmente para la elaboración de chocolate, al igual que el licor del cacao, aunque también se puede emplear para la elaboración de productos cosméticos como jabones o cremas (ICCO, 2018; ECA, 2018).
4. **Torta natural:** la torta de cacao es la masa sólida que se obtiene tras prensar el licor.
5. **Cacao en polvo:** el cacao en polvo es el producto que se obtiene de la torta del cacao tras su trituración. El cacao en polvo puede usarse como ingrediente en una gran variedad de productos alimenticios ya que mantiene el aroma, color y sabor tradicionales del cacao. Por ejemplo, se usa en bebidas, postres como helados y mousse, tortas, salsas de chocolate, y en repostería para la elaboración de pasteles y galletas. Además, se utiliza mucho para la elaboración de confitería, trufas y para cafés como el cappuccino (ICCO, 2018; ECA, 2018).

### 1.3 Funcionalidad del cacao

Además de sus propiedades organolépticas, el cacao tiene efectos beneficiosos para la salud, principalmente en la prevención de enfermedades cardiovasculares. Éstas vienen dadas no sólo por el tipo de grasa presente en la manteca del cacao, sino también por la presencia de unos compuestos químicos denominados fitoquímicos (ICCO, 2018). Los fitoquímicos son unos compuestos químicos presentes en las plantas, que si bien no se consideran nutritivos, presentan propiedades preventivas hacia algunas enfermedades (Chede, 2013).

Existen varios grupos de fitoquímicos, entre los que se encuentran los polifenoles o compuestos fenólicos. Estos compuestos presentan una elevada capacidad antioxidante, siendo capaces de inhibir la peroxidación lipídica, lo que evita la presencia de radicales libres, los cuales aumentan el riesgo de desarrollar cáncer y enfermedades cardiovasculares (Keen, 2001; Padilla *et al.*, 2008). La presencia de polifenoles en el cacao lo cataloga como ingrediente funcional que presenta beneficios para la salud, esto hace que la industria lo considere un alimento interesante a tener en cuenta (Wollgast y Anklam., 2000).

Sin embargo, el procesado del haba del cacao desde su recolección hasta el producto final afecta en gran medida al contenido en polifenoles, y por tanto, su capacidad antioxidante y funcional se puede ver ampliamente afectada (Perea-Villamil *et al.*, 2009). De hecho, se ha descrito en bibliografía que el contenido en polifenoles disminuye durante las etapas de fermentación, secado y sobre todo durante la etapa de alcalinización (Perea-Villamil *et al.*, 2009), por lo que con el fin de delimitar su carácter funcional es necesario determinar el contenido en polifenoles que presentan los productos comerciales.

### 1.4 Compuestos fenólicos en el cacao

En el reino vegetal existe una gran cantidad de compuestos fitoquímicos, que se pueden dividir en cuatro grupos: los compuestos fenólicos, terpénicos, azufrados y nitrogenados (Tomás-Barberán, 2003). Los compuestos fenólicos incluyen una gran cantidad de sustancias con estructuras químicas diferentes. Dependiendo de su estructura, se pueden dividir a su vez en flavonoides, los fenil propanoides, los estilbenoides y los

derivados del benzoico. (Tomás-Barberán, 2003). A continuación, se muestran los principales grupos de compuestos fenólicos con los subgrupos que indica Tomás-Barberán (2003) que algunos grupos tienen:

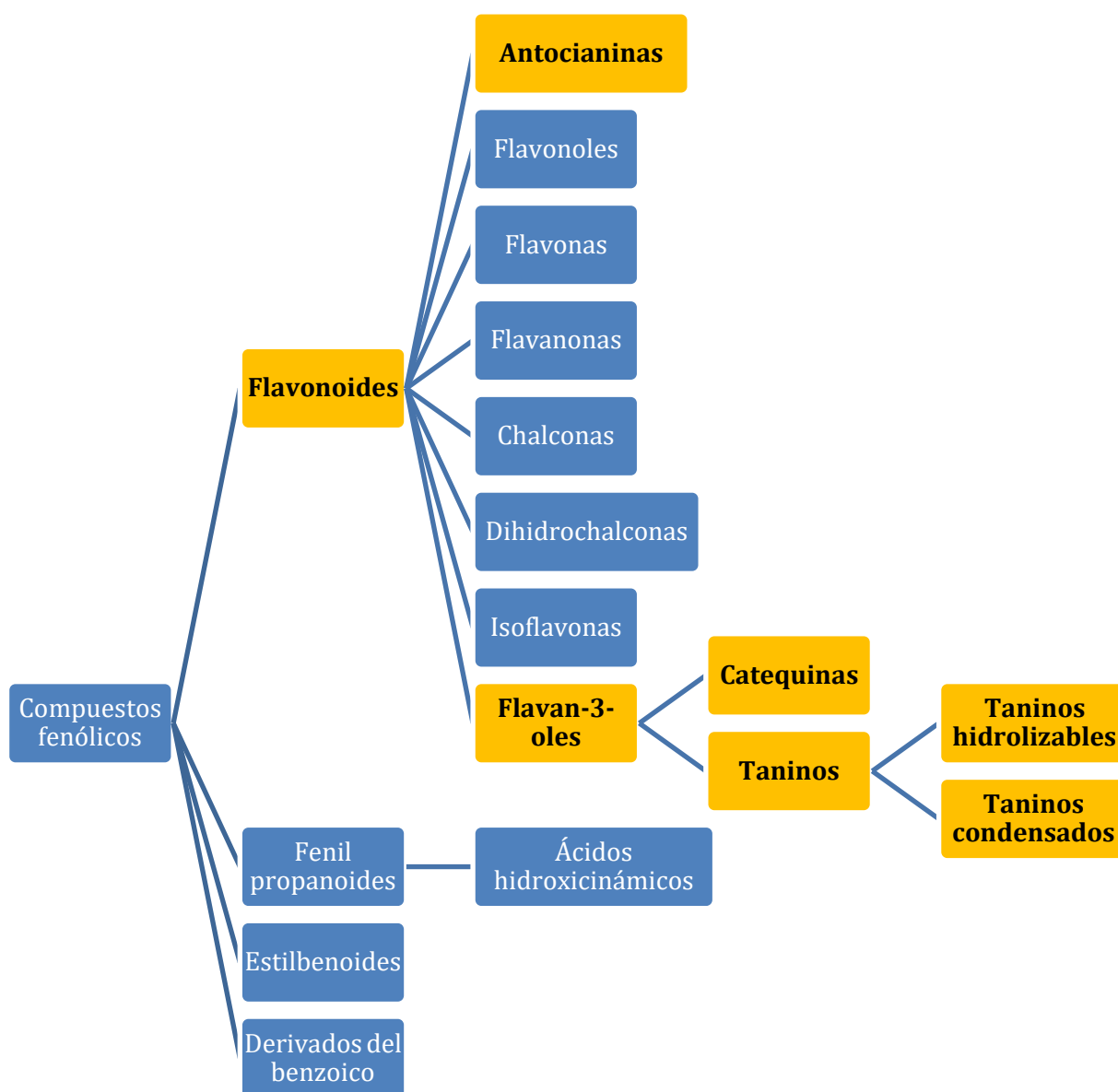
- **Flavonoides:** Dentro del grupo de los flavonoides se encuentran principalmente las antocianinas, los flavonoles, las flavonas, las flavanonas, las chalconas, las dihidrochalconas, las isoflavonas y por último los flavan-3-oles.
- **Fenil propanoides:** en este grupo se incluyen a los compuestos derivados de ácidos hidroxicinámicos.
- **Estilbenoides:** tales como el resveratrol.
- **Derivados del benzoico:** tales como el ácido gálico y elágico.

Dentro del subgrupo de los flavan-3-oles se encuentran las catequinas (catequina y epicatequina), que son compuestos monoméricos, y las proantocianidinas o taninos condensados, que son compuestos poliméricos formados por monómeros de catequina y epicatequina (Herrmann, 1995; Bravo, 1998).

Los principales polifenoles presentes en las semillas del cacao son las catequinas, las antocianinas y las proantocianidinas, en un porcentaje en semillas secas y libres de grasa respectivamente del 37% en catequinas, 4% de antocianinas y del 58% de proantocianidinas. Dentro de las catequinas, la más abundante es la epicatequina, que comprende aproximadamente el 35% del total de polifenoles (Hii *et al.*, 2009).

Por lo general, cuando se hacen estudios sobre el contenido de polifenoles en muestras vegetales, éste suele venir referido únicamente a los polifenoles extractables, es decir, no se tienen en consideración los polifenoles presentes en el residuo que se obtiene tras la extracción acuosa o hidroalcohólica, y que se denominan polifenoles no extractables (Arranz *et al.*, 2009). Los polifenoles no extractables se pueden dividir en polifenoles o taninos hidrolizables y proantocianidinas no extractables o taninos condensados (Arranz *et al.*, 2009). Estos polifenoles no extractables son de elevada importancia a nivel funcional ya que son capaces de generar un ambiente antioxidante en el colon, que puede derivar en efectos importantes para la salud gastrointestinal, pudiendo incluso llegar a prevenir el cáncer de colon. Es por ello que su determinación debería de ser realizada con el fin de obtener el mapa completo de polifenoles presentes en el cacao (Arranz *et al.*, 2009).

En la **Figura 2** se muestra un esquema con las principales familias de polifenoles tal y como ha sido descrito anteriormente, donde los compuestos presentes en el cacao se han marcado de color naranja.



**Figura 2.** Esquema con las principales familias de polifenoles. Los compuestos presentes en el cacao se han marcado en naranja.

## 2. OBJETIVOS

El objetivo principal del trabajo es determinar el contenido de polifenoles extractable y no extractable de una colección de muestras de cacao en polvo provenientes de 3 orígenes distintos (Costa de Marfil, Ghana e Indonesia) que a su vez han sido sometidos a diferentes grados de alcalinización. Para ello, se determinará la capacidad antioxidante y el contenido en polifenoles totales de la fracción extractable, así como el contenido de catequina y epicatequina presente en la misma mediante HPLC. A continuación, se procederá a la extracción de los polifenoles presentes en la fracción no extractable, donde se determinará el contenido de catequina y epicatequina. A partir de los datos obtenidos, se estudiarán las diferencias observadas en los cacaos en polvo en función de su origen y del grado de alcalinización.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Materia prima y reactivos

Para la realización de este trabajo se utilizaron 15 muestras de cacao en polvo proporcionadas por Olam Food Ingredients Spain (Cheste, España). Estas muestras comprendían 3 cacaos naturales y 12 cacaos alcalinos elaborados en planta piloto a partir de los cacaos naturales. Los cacaos naturales provenían de tres países productores de cacao distintos: Costa de Marfil (CM), Ghana (GA) e Indonesia (IN). Cada una de las materias primas fue sometida a 4 grados de alcalinización diferentes aplicando condiciones de procesamiento cada vez más severas (concentración de álcali, tiempo y temperatura), dando lugar a los cacaos alcalino suave (AS), alcalino medio (AM), alcalino fuerte (AF), y alcalino super fuerte (ASF) para cada uno de los orígenes.

Los reactivos que se utilizaron para la realización de este estudio son los siguientes: ácido clorhídrico (37%), metanol (grado reactivo), acetona, acetonitrilo y metanol (grado HPLC), ácido gálico monohidrato, carbonato de sodio anhidro, reactivo de fenol según Folin-Ciocalteu, ácido sulfúrico 95-97% y cloruro de sodio (Scharlab, Barcelona, España), ácido acético glacial 99,8% e hidróxido sódico (Labkem, Barcelona, España), trolox 97% (Acros Organics, New Jersey, EUA) y 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Como patrones se utilizaron la catequina (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, EUA) y la epicatequina (Sigma-Aldrich).

#### 3.2 Extracción y análisis de polifenoles extractables

##### 3.2.1 Obtención del extracto

La extracción de los polifenoles extractables de las muestras se realizó siguiendo el método descrito por [Arranz et al. \(2009\)](#) pero con algunas modificaciones. Concretamente, para la obtención del extracto se pesó 1 g de cacao en polvo al que se le adicionaron 40mL de una solución 1:1 (v/v) de HCl 16mM:metanol. La mezcla se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 1h y luego se centrifugó durante 15 minutos a 4°C y 10000 rpm. El sobrenadante se separó y al residuo sólido resultante se le adicionaron 40mL de una solución de acetona y agua (70:30, v/v). La mezcla se mantuvo de nuevo durante 1h en agitación y se volvió a centrifugar. Finalmente, ambos sobrenadantes se mezclaron y se llevaron a un volumen final de 100mL con agua destilada. El residuo sólido se liofilizó y se almacenó para la extracción de los polifenoles no extractables. Se realizaron tres extracciones por cada muestra de cacao en polvo.

##### 3.2.2 Determinación del contenido en polifenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu

El contenido en polifenoles totales se determinó espectrofotométricamente empleando el método de Folin-Ciocalteu. En un tubo de ensayo se introdujeron 50 µL de extracto fenólico, 450 µL de metanol/agua (50:50, v/v), 4 mL de carbonato cálcico al 10% y 5 mL de una solución de Folin-Ciocalteu diluido 1:10 (v/v). A continuación, se dejó reposar en oscuridad durante 1h a temperatura ambiente, y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (Helios Zeta UV-VIS, Thermo scientific, Hampton, Nuevo Hampshire, Estados Unidos) a 765 nm. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico (GAE) por 100 gramos de cacao. La curva de calibración se preparó en el

intervalo de concentraciones de 50-1000 mg L<sup>-1</sup> de ácido gálico. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

### 3.2.3 Determinación de la capacidad antioxidante por el método DPPH

El método empleado para la determinación de la actividad antioxidante del extracto polifenólico se basa en la inhibición del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH). Para ello, se mezclaron 6 µL de extracto fenólico con 294 µL de metanol y 2,7 mL de una disolución metanólica de DPPH (25 mg L<sup>-1</sup>). La mezcla se dejó incubar a temperatura ambiente durante 1h en condiciones de oscuridad y finalmente se midió la absorbancia a 517 nm en el espectrofotómetro. Los resultados se expresaron como mg equivalente de trolox por 100 g de cacao. La curva de calibración se preparó en el intervalo de concentraciones de 5-50 mg L<sup>-1</sup> de trolox. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

### 3.2.4 Cuantificación de catequina y epicatequina mediante RP-HPLC

El contenido de catequina y epicatequina en las muestras de cacao en polvo se cuantificó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa (RP) empleando un cromatógrafo LaChrom Elite de Hitachi Ltd. (Tokio, Japón) (ver **Figura 3**). El cromatógrafo empleado contenía un muestreador automático y un detector de UV (modelos L-220 y L-2400, respectivamente). Las determinaciones se realizaron usando una columna modelo Liquid Purple C18 de 5 µm (250 x 4,6 mm i.d.) de Análisis Vínicos (Tomelloso, España).

La fase móvil fue preparada mezclando ácido acético acuoso al 2% (fase A) y una mezcla ternaria compuesta por ácido ACN-H<sub>2</sub>O-ácido acético a una proporción 40: 9: 1 (v/v/v) (fase B). El gradiente empleado (adaptado de [Elwers \*et al.\* \(2009\)](#)) fue el siguiente: 0-8 min, 10% B; 8-20 min, 10-15% de B; 20-35 min, 15-90% de B; 35-50 min, 90% B y seguidamente se volvió a las condiciones iniciales. La detección UV se realizó a 280 nm; la temperatura de la columna fue de 40 °C; el volumen de inyección fue de 20 µL y el caudal empleado fue de 1.2 mL min<sup>-1</sup>.



**Figura 3.** Equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) empleado.

### **3.3 Extracción y análisis de polifenoles no extractables**

#### **3.3.1 Obtención del extracto**

El extracto de la fracción polifenólica no extractable se obtuvo mediante una hidrólisis ácida del residuo sólido obtenido en la fase 3.2.1. Este método fue llevado a cabo para determinar la cantidad de catequina y epicatequina hidrolizable retenida en el residuo sólido restante que quedaba tras la extracción de la fase fenólica soluble. La extracción se realizó siguiendo el método empleado por [Hartzfeld et al. \(2002\)](#) pero con algunas modificaciones. Para ello se pesaron 50 mg de residuo de cacao y se mezclaron con una disolución de metanol/ácido sulfúrico concentrado al 95-97% en proporción 90:10 (v/v). La mezcla resultante se dejó reaccionar a 85°C durante 24 h. Previamente al análisis por HPLC, la muestra se neutralizó con NaOH 10 M.

#### **3.3.2 Cuantificación de catequina y epicatequina mediante RP-HPLC**

La cuantificación de catequina y epicatequina se realizó por HPLC siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.2.4.

### **3.4 Análisis estadístico**

Una vez obtenidos todos los resultados, se realizó un análisis estadístico de los datos obtenidos empleando el programa Statgraphics Centurion XVI.II (StatPoint Technologies, Inc., 2011). Con el fin de comprobar el efecto del origen y de los distintos grados de alcalinización para cada uno de los orígenes, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA). Además, se realizó también un análisis LSD (mínima diferencia

significativa) para observar si existían diferencias entre los distintos orígenes para un mismo grado de alcalinización, así como para observar las diferencias existentes entre los distintos niveles de alcalinización para un mismo origen, a un nivel de significación del 5%.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Polifenoles extractables

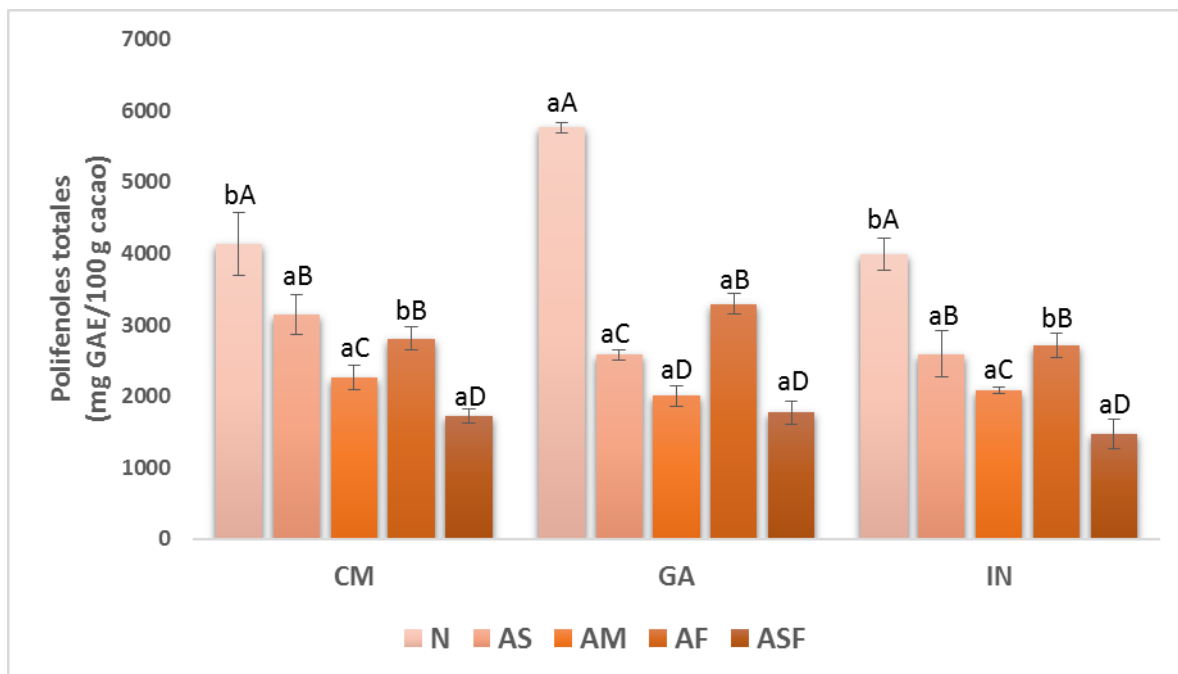
#### 4.1.1 Determinación del contenido en polifenoles totales

El contenido en polifenoles totales obtenido mediante el método de Folin-Ciocalteu para las muestras objeto de estudio se muestra en la **Figura 4**. Se obtuvieron valores comprendidos entre 1720 y 4100 mg GAE/100 g de cacao para las muestras de Costa de Marfil, entre 1800 y 5770 mg GAE/100 g cacao para las muestras procedentes de Ghana, mientras que para las muestras de Indonesia los valores se encontraron entre los 1500 y los 4000 mg GAE/100 g de cacao. En todos los casos, los valores obtenidos son similares a los reportados por [Miller \*et al.\* \(2008\)](#), el cual obtiene unos valores entre 4500 y 6000 mg GAE/100 g para cacaos naturales. Además existen estudios tales como los realizados por [Padilla \*et al.\* \(2008\)](#) y [Lecumberri \*et al.\* \(2007\)](#) que indican valores similares para tortas de cacao naturales.

Para todos los orígenes, el mayor contenido en polifenoles totales se observó en las muestras de cacao natural. Sin embargo, sólo el cacao natural de Ghana mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto a los cacaos naturales de Costa de Marfil e Indonesia. Comparando los demás grados de alcalinización para los diferentes orígenes, solamente los cacaos alcalinos fuertes (AF) mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre el cacao de Ghana y los de Costa de Marfil e Indonesia, no observándose diferencias para los demás grados de alcalinización con respecto al origen.

Atendiendo a un mismo origen, se observó que un aumento en el grado de alcalinización dio lugar a una disminución estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) en el contenido en polifenoles totales de la fracción extractable, obteniéndose los valores más bajos en las muestras de cacao alcalino super fuerte (ASF). Esta tendencia confirma que las altas presiones, temperaturas y concentraciones de álcali a las que se somete el cacao dan lugar a la pérdida de gran parte del contenido en polifenoles del mismo. Este mismo comportamiento ha sido observado por otros autores, como [Sulistiyowati y Misnawi \(2008\)](#), que indican que el contenido en polifenoles totales tiende a disminuir a medida que aumenta el grado de alcalinización.





**Figura 4.** Contenido en polifenoles totales (media  $\pm$  sd, mg GAE/100g cacao) de la fracción extractable de cacaos en polvo de orígenes Costa de Marfil (CM), Ghana (GA) e Indonesia (IN) naturales (N) y con diferentes grados de alcalinización: alcalino suave (AS), alcalino medio (AM), alcalino fuerte (AF) y alcalino super fuerte (ASF). Diferentes letras minúsculas para un mismo grado de alcalinización indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre diferentes orígenes. Diferentes letras mayúsculas para un mismo origen indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre diferentes grados de alcalinización. Todos los análisis fueron realizados por triplicado.

Si bien, tal y como hemos comentado anteriormente, la tendencia del contenido en polifenoles totales es a disminuir conforme aumenta el grado de alcalinización, para los tres orígenes se observó un aumento estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) del contenido en polifenoles totales para los alcalinos fuertes (AF) con respecto al contenido obtenido para los cacaos alcalinos medios (AM). Este hecho podría deberse a que durante el proceso de alcalinización se liberan polifenoles que en los otros niveles de alcalinización se encontraban retenidos, lo que hace que aumente el contenido en polifenoles totales.

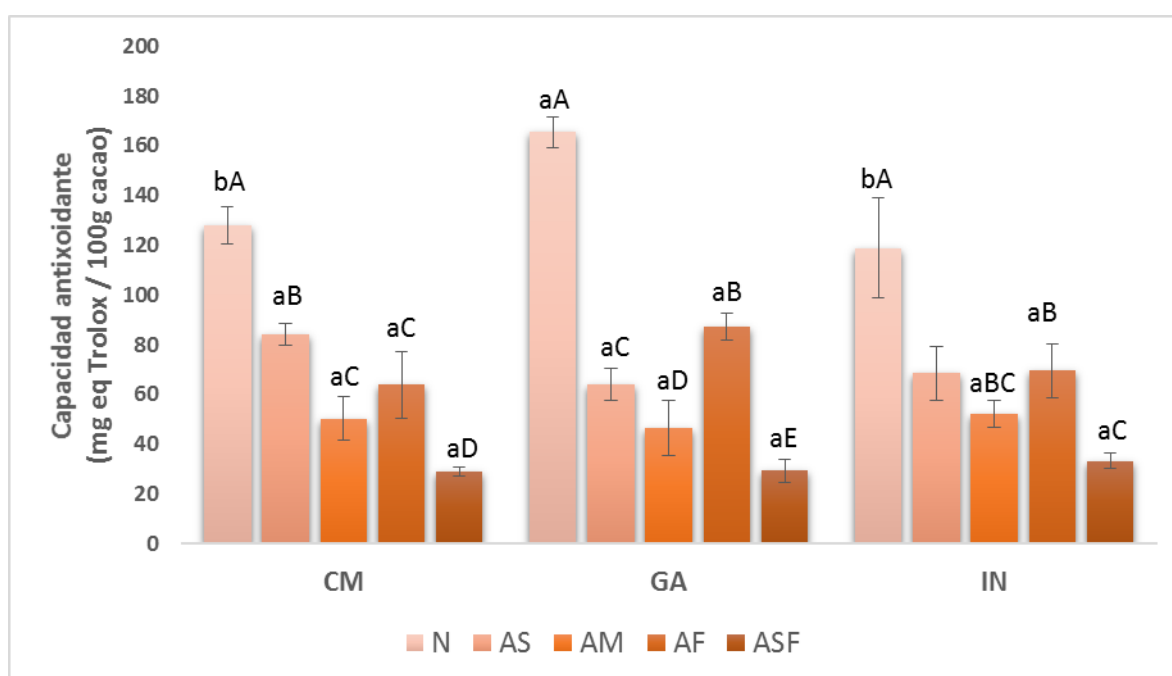
#### 4.1.2 Determinación de la capacidad antioxidante

La **Figura 5** muestra los valores de capacidad antioxidante obtenidos para el conjunto de muestras objeto de estudio. Como se puede observar en esta figura, los valores de la capacidad antioxidante oscilaron entre 29-128, 29-165 y 33-120 mg equivalentes de trolox por 100 g de cacao para los orígenes Costa de Marfil, Ghana e Indonesia, respectivamente.

En consonancia con los resultados obtenidos para el contenido en polifenoles totales, los valores más elevados en capacidad antioxidante de la fracción extractable se observaron también en los cacaos naturales. Análogamente, el valor más alto encontrado fue para el cacao natural de Ghana (165 mg equivalentes de trolox por 100 g de cacao), que mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto a los cacaos naturales de Costa de Marfil e Indonesia. Este hecho podría

deberse a que el cacao procedente de Ghana hubiera sido completamente fermentado (Camu *et al.*, 2008).

En la **Figura 5** también se puede apreciar cómo la capacidad antioxidante de las muestras disminuye al incrementarse el grado de alcalinización de los cacaos en polvo, registrándose los valores más bajos en las muestras de cacao alcalino super fuerte (ASF), al igual que se ha comentado en el apartado 4.1.1. Este mismo comportamiento fue observado también por Mazor *et al.* (2011), Sulistyowati y Misnawi (2008) y Miller *et al.* (2008).



**Figura 5.** Valores de capacidad antioxidante (media  $\pm$  sd, mg equivalentes de trolox/100g cacao) de la fracción extractable de cacaos en polvo de orígenes Costa de Marfil (CM), Ghana (GA) e Indonesia (IN) naturales (N) y con diferentes grados de alcalinización: alcalino suave (AS), alcalino medio (AM), alcalino fuerte (AF) y alcalino super fuerte (ASF). Diferentes letras minúsculas para un mismo grado de alcalinización indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre diferentes orígenes. Diferentes letras mayúsculas para un mismo origen indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre diferentes grados de alcalinización. Todos los análisis fueron realizados por triplicado.

Análogamente a lo observado para el contenido en polifenoles totales, para los tres orígenes se observó un aumento estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) de la capacidad antioxidante en las muestras de cacao alcalino fuerte (AF) con respecto al contenido obtenido para los cacaos alcalinos medios (AM). Este incremento de la capacidad antioxidante podría deberse a la liberación de polifenoles retenidos durante la alcalinización, tal y como se ha explicado en el apartado anterior (4.1.1).

Por otra parte, cabe destacar que, pese a que en los cacaos naturales se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en función del origen del cacao, para el resto de niveles de alcalinización no se observaron diferencias significativas con respecto al origen de la muestra.

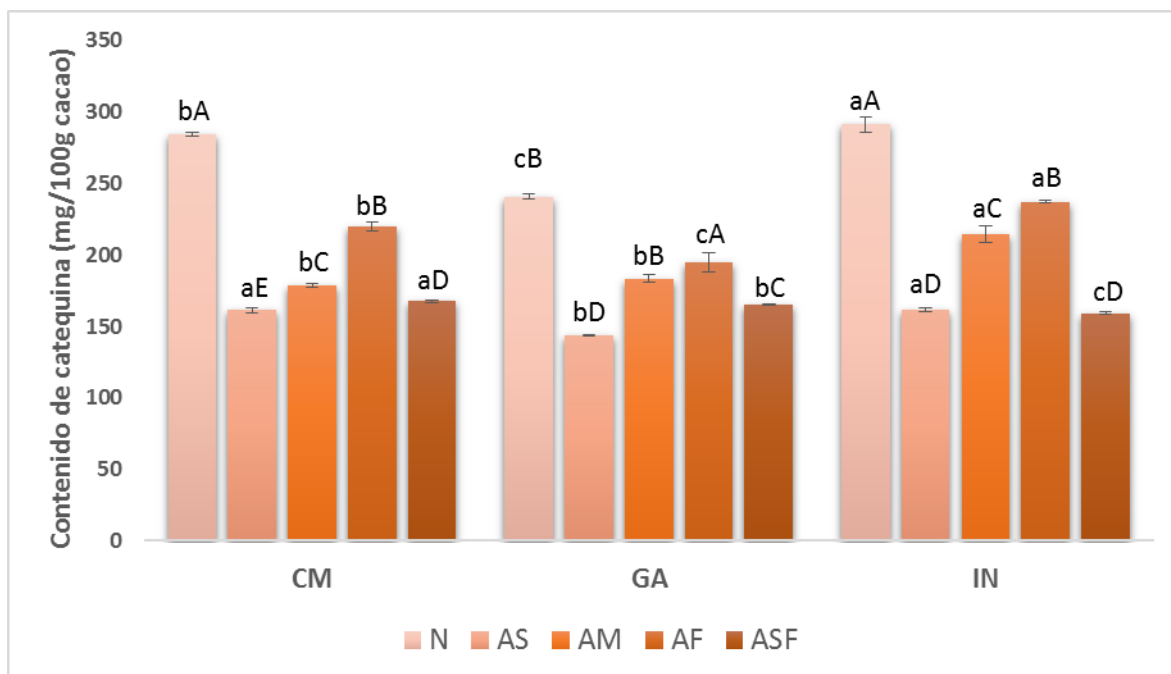
Por último, comparando las figuras 4 y 5, se puede concluir que existe una correlación entre el contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante. La correlación

existente entre ambos parámetros (polifenoles totales y capacidad antioxidante) ha sido previamente descrita por autores como [Othman et al. \(2007\)](#), [Nazario et al. \(2014\)](#) y [Miller et al. \(2008\)](#), quienes indican que valores altos de ambos parámetros se deben a la capacidad que poseen los polifenoles de ceder electrones para generar una respuesta antioxidante.

#### 4.1.3 Determinación del contenido de catequina

El contenido de catequina extractable presente en las muestras objeto de estudio, establecido mediante RP-HPLC, se muestra en la **Figura 6**. Los valores obtenidos oscilaron entre 167,7-284, 143,9-240,6 y 159,3-291 mg de catequina/ 100 g cacao para los cacaos procedentes de Costa de Marfil, Ghana e Indonesia, respectivamente. Estos valores son comparables a los reportados por [Gu et al. \(2006\)](#), que obtuvo valores comprendidos entre 41 y 348 mg de catequina/ 100 g cacao.

Al igual que se observó para el contenido en polifenoles totales y capacidad antioxidante, las muestras de cacao natural para cada uno de los orígenes proporcionaron en todos los casos el mayor contenido en catequina, siendo el contenido obtenido estadísticamente diferente para cada uno de los orígenes. Para el resto de grados de alcalinización, en todos los casos se observó al menos un origen con diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).



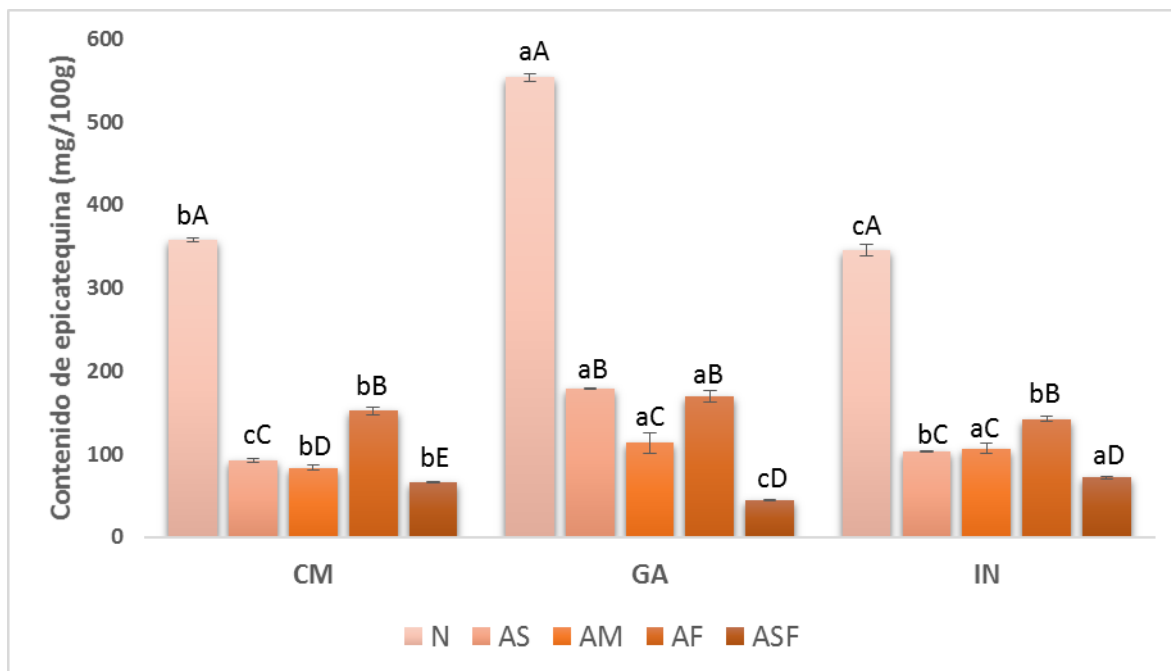
**Figura 6.** Contenido de catequina (media  $\pm$  sd, mg de catequina/ 100g de cacao) de la fracción extractable de cacaos en polvo de orígenes Costa de Marfil (CM), Ghana (GA) e Indonesia (IN) naturales (N) y con diferentes grados de alcalinización: alcalino suave (AS), alcalino medio (AM), alcalino fuerte (AF) y alcalino super fuerte (ASF). Diferentes letras minúsculas para un mismo grado de alcalinización indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre diferentes orígenes. Diferentes letras mayúsculas para un mismo origen indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre diferentes grados de alcalinización. Todos los análisis fueron realizados por triplicado.

Para cada uno de los orígenes, se observó que a medida que aumentó el grado de alcalinización disminuyó el contenido en catequina extractable, siendo el cacao alcalino super fuerte el que proporcionó los valores más bajos, confirmándose la influencia que posee el proceso de alcalinización en el contenido de catequina extractable. Sin embargo, esta tendencia, si bien es clara al comparar los cacaos naturales, alcalinos suaves y alcalinos super fuertes, no fue la seguida en el caso de los cacaos alcalinos medios y alcalinos suaves, donde, para los tres orígenes, se observó un aumento del contenido de catequina con respecto al valor obtenido para su correspondiente cacao alcalino suave. Este hecho, tal y como se ha mencionado en los apartados anteriores, podría deberse a que durante el proceso de alcalinización se liberan monómeros de catequina que en el cacao natural y alcalino suave se encontraban formando polímeros, lo que hace que aumente el contenido en catequina para estas muestras. La tendencia a que el contenido de catequina disminuya al aumentar el grado de alcalinización ha sido previamente reportado por autores como [Payne \*et al.\* \(2010\)](#) y [Andrés-Lacueva \*et al.\* \(2008\)](#), los cuales, tras comparar el contenido en catequinas y epicatequinas de cacaos de un mismo origen con distintos grados de alcalinización, obtuvieron una disminución del contenido al aumentar el grado de alcalinización.

#### 4.1.4 Determinación del contenido de epicatequina

El contenido de epicatequina extractable presente en las muestras objeto de estudio, establecido mediante RP-HPLC, se muestra en la **Figura 7**. Los valores obtenidos oscilaron entre 66,3-358, 45,3-554 y 72-346 mg de epicatequina/ 100 g cacao para los cacaos procedentes de Costa de Marfil, Ghana e Indonesia, respectivamente.

Análogamente a lo observado con el resto de parámetros, de nuevo el mayor contenido de epicatequina se obtuvo para los cacaos naturales, siendo el cacao natural de Ghana el que proporcionó un mayor contenido (554 mg de epicatequina/ 100 g cacao) al ser comparado con los obtenidos para Costa de Marfil (358 mg de epicatequina/ 100 g cacao) e Indonesia (346 mg de epicatequina/ 100 g cacao). Este mismo hecho ocurre en estudios como el de [Othman \*et al.\* \(2010\)](#). Para el resto de grados de alcalinización, en todos los casos se observó al menos un origen con diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).



**Figura 7.** Contenido de epicatequina (media  $\pm$  sd, mg de epicatequina/ 100g de cacao) de la fracción extractable de cacaos en polvo de orígenes Costa de Marfil (CM), Ghana (GA) e Indonesia (IN) naturales (N) y con diferentes grados de alcalinización: alcalino suave (AS), alcalino medio (AM), alcalino fuerte (AF) y alcalino super fuerte (ASF). Diferentes letras minúsculas para un mismo grado de alcalinización indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre diferentes orígenes. Diferentes letras mayúsculas para un mismo origen indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre diferentes grados de alcalinización. Todos los análisis fueron realizados por triplicado.

Para cada uno de los orígenes, al igual que para la catequina, se observó que a medida que aumentó el grado de alcalinización disminuyó el contenido en epicatequina extractable, tal y como reportan [Payne et al. \(2010\)](#) y [Andrés-Lacueva et al. \(2008\)](#), si bien, al igual que se observó para la catequina, el contenido de epicatequina aumentó en los cacaos alcalinos fuertes (AF) con respecto al obtenido para los cacaos alcalinos medios (AM). Esta tendencia, análoga a la encontrada para el resto de parámetros, se puede de nuevo explicar atendiendo a la posible liberación de moléculas de epicatequina previamente retenidas al aplicar condiciones de alcalinización más fuertes.

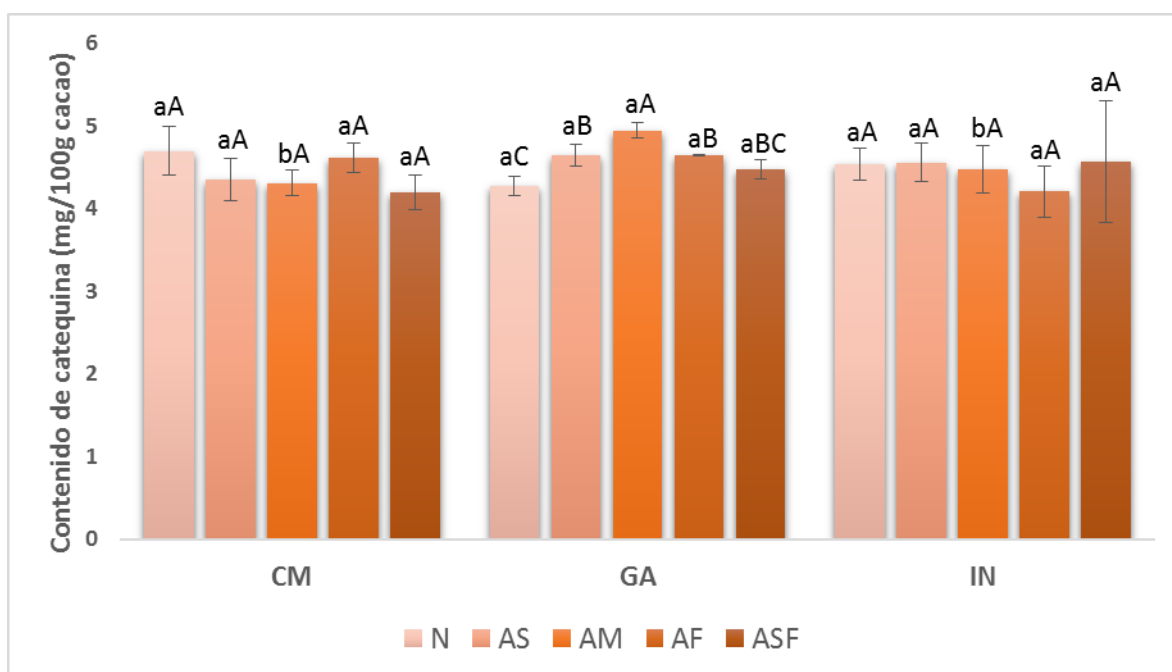
## 4.2 Polifenoles no extractables

Una vez extraídos todos los polifenoles extractables de la muestra, se pasó a extraer todos aquellos no extractables mediante un método de hidrólisis ácida. Esta hidrólisis condujo la obtención de un segundo extracto, del cual se analizó el contenido en catequina y epicatequina.

### 4.2.1 Determinación del contenido de catequina

Como se puede observar en la **Figura 8** el contenido de catequina en la fracción no extractable osciló entre 4.20 y 4.70 mg de catequina / 100 g de cacao para las muestras de Costa de Marfil, entre 4.30 y 4.95 mg para las muestras de Ghana y entre 4.20 y 4.60 mg / 100 g para las muestras de Indonesia.

En comparación con los valores de catequina hallados en la fracción extractable, estos valores son muy inferiores. Esto apunta a que, o bien en el cacao en polvo la mayoría de los polifenoles son extractables o a que el método de hidrólisis seguido no es el adecuado. Debido a la novedad de este tipo de análisis en cacao en polvo, no se han podido establecer correlaciones entre nuestros datos y los obtenidos por otros autores, por lo que para poder establecer cuál es la razón del escaso contenido en catequina presente en la fracción no extractable será necesario la comparación con otros métodos descritos en la bibliografía, por ejemplo, métodos de hidrólisis enzimática.



**Figura 8.** Contenido de catequina (media  $\pm$  sd, mg de epicatequina/ 100g de cacao) de la fracción no extractable de cacaos en polvo de orígenes Costa de Marfil (CM), Ghana (GA) e Indonesia (IN) naturales (N) y con diferentes grados de alcalinización: alcalino suave (AS), alcalino medio (AM), alcalino fuerte (AF) y alcalino super fuerte (ASF). Diferentes letras minúsculas para un mismo grado de alcalinización indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre diferentes orígenes. Diferentes letras mayúsculas para un mismo origen indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre diferentes grados de alcalinización. Todos los análisis fueron realizados por triplicado.

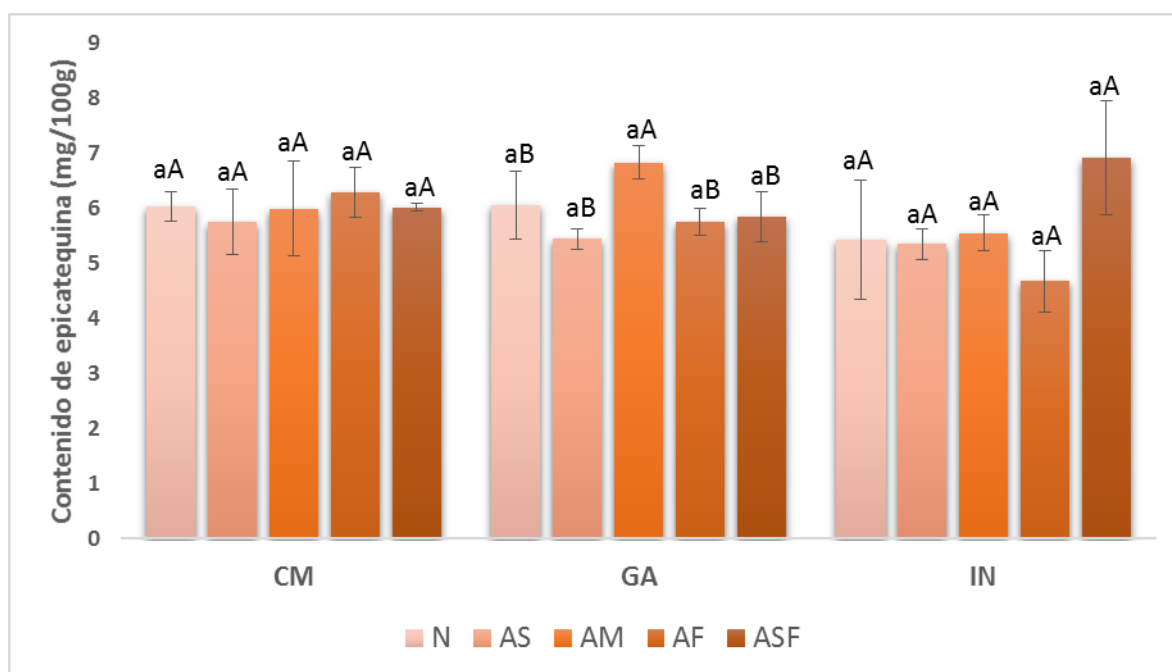
Por último, el análisis estadístico reveló que, con excepción de las muestras alcalinas medias, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tres orígenes para cada uno de los niveles de alcalinización. Dentro de un mismo origen, se encontró una ligera variación en el contenido de catequina que sólo fue significativa en el caso de las muestras de origen Ghana.

#### 4.2.2 Determinación del contenido de epicatequina

Como se puede observar en la **Figura 9**, la cantidad de epicatequina obtenida tras la hidrólisis ácida en los residuos sólidos restantes de la fase de extracción, para las muestras con origen en Costa de Marfil está comprendida entre 5.80 y 6.30 mg/100 g de cacao, para las muestras procedentes de Ghana los valores se encuentran entre 5.50 y 6.80 mg/100 g, y para las muestras de Indonesia entre 4.70 y 7 mg. Tal y como

ocurre con el contenido en catequina, estos valores fueron bastante inferiores a los hallados en la fracción extractable.

Por otra parte, en la figura se observa que no existen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre orígenes para ninguno de los grados de alcalinización. Al igual ocurre entre los distintos niveles de alcalinización para un mismo origen, donde apenas existen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). El único origen donde hay diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) es en Ghana, en el cual se diferencian dos grupos distintos.



**Figura 9.** Valores del contenido de epicatequina (media  $\pm$  sd) de la fracción no extractable de cacaos en polvo de orígenes Costa de Marfil (CM), Ghana (GA) e Indonesia (IN) naturales (N) y con diferentes grados de alcalinización: alcalino suave (AS), alcalino medio (AM), alcalino fuerte (AF) y alcalino super fuerte (ASF). Diferentes letras minúsculas para un mismo grado de alcalinización indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre diferentes orígenes. Diferentes letras mayúsculas para un mismo origen indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre diferentes grados de alcalinización. Todos los análisis fueron realizados por triplicado.

## 5. CONCLUSIONES

En este trabajo se han empleado diferentes métodos para caracterizar el contenido en polifenoles extractables y no extractables de cacaos en polvo de tres orígenes distintos, a diferentes niveles de alcalinización.

Los resultados obtenidos para los polifenoles extractables muestran que distintos orígenes dan lugar a un distinto contenido en polifenoles y que la alcalinización del cacao provoca una disminución en el contenido de polifenoles totales, y por consiguiente de capacidad antioxidante. La cuantificación de catequina y epicatequina ha permitido establecer que la epicatequina es la especie mayoritaria, observándose la misma tendencia que en los parámetros anteriores.

Para la caracterización de la fracción de polifenoles no extractables se realizó una hidrólisis ácida. Estos análisis permitieron cuantificar el contenido de catequina y epicatequina, observándose que el contenido de ambos analitos fue muy inferior al de la fracción extractable. Con lo cual se puede concluir que, o la concentración de estos compuestos es muy baja en esta fracción o que el método de hidrólisis utilizado no es capaz de liberar estos compuestos. Para confirmar estos resultados sería conveniente comparar estos resultados con los obtenidos tras hidrolizar la fracción no extractable con otros métodos.



## 6. BIBLIOGRAFÍA

- ANDRES-LACUEVA, C., MONAGAS, M., KHAN, N., IZQUIERDO-PULIDO, M., URPI-SARDA, M., PERMANYER, J., & LAMUELA-RAVENTOS, R. M. (2008). Flavanol and flavonol contents of cocoa powder products: influence of the manufacturing process. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(9), 3111-3117.
- ARRANZ, S., SAURA-CALIXTO, F., SHAHA, S., & KROON, P. A. (2009). High contents of nonextractable polyphenols in fruits suggest that polyphenol contents of plant foods have been underestimated. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(16), 7298-7303.
- BOLETÍN OFICIAL DEL ESTADO (BOE). Real Decreto 822/1990, de 22 de junio, por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración, circulación y comercio del cacao y chocolate.
- BRAVO, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews*, 56(11), 317-333.
- CAMU, N., DE WINTER, T., ADDO, S. K., TAKRAMA, J. S., BERNAERT, H., & DE VUYST, L. (2008). Fermentation of cocoa beans: influence of microbial activities and polyphenol concentrations on the flavour of chocolate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(13), 2288-2297.
- CHEDE, P. S. (2013). Phytochemical analysis of Citrus sinensis peel. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 4(1), 339-343.
- DE ZAAAN COCOA, 2013. Cocoa & Chocolate manual. ADM Cocoa, Suiza, 171pp.
- ELWERS, S., ZAMBRANO, A., ROHSIUS, C., & LIEBEREI, R. (2009). Differences between the content of phenolic compounds in Criollo, Forastero and Trinitario cocoa seed (*Theobroma cacao* L.). *European Food Research and Technology*, 229(6), 937-948.
- EUROPEAN COCOA ASSOCIATION (ECA) <https://www.eurococoa.com/es/> Fecha de la consulta: 18 de Junio de 2018
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO) <http://www.fao.org/docrep/006/ad220e/AD220E06.htm> Fecha de consulta: 19 de Junio de 2018
- GIACOMETTI, J., JOLIĆ, S. M., & JOSIĆ, D. (2015). Cocoa processing and impact on composition. In *Processing and impact on active components in food* (pp. 605-612).
- GU, L., HOUSE, S. E., WU, X., OU, B., & PRIOR, R. L. (2006). Procyanidin and catechin contents and antioxidant capacity of cocoa and chocolate products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(11), 4057-4061.
- HANSEN, C. E., DEL OLMO, M., & BURRI, C. (1998). Enzyme activities in cocoa beans during fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77(2), 273-281.
- HARTZFELD, P. W., FORKNER, R., HUNTER, M. D., & HAGERMAN, A. E. (2002). Determination of hydrolyzable tannins (gallotannins and ellagitannins) after reaction with potassium iodate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(7), 1785-1790.
- HERRMANN, K. (1995). Neuere Erkenntnisse ueber Kakao-inhaltsstoffe-II. Catechine und Procyanidine und deren oxidative Kondensation sowie Ballaststoffe der Kakaoschalen. *GORDIAN-HAMBURG-*, 95, 141-141.
- HIL, C. L., LAW, C. L., SUZANNAH, S., & CLOKE, M. (2009). Polyphenols in cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, 2(4), 702-722.
- INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION (ICCO) <https://www.icco.org/> Fecha de consulta: 18 de Junio de 2018

- JINAP, S. (1994). Organic acids in cocoa beans-a review. *ASEAN Food Journal (Malaysia)*.
- KEEN, C. L. (2001). Chocolate: food as medicine/medicine as food. *Journal of the American College of Nutrition*, 20(sup5), 436S-439S.
- KIM, H., & KEENEY, P. G. (1984). (-)-Epicatechin Content in Fermented and Unfermented Cocoa Beans. *Journal of Food Science*, 49(4), 1090-1092.
- KONO, Y., SHIBATA, H., KODAMA, Y., & SAWA, Y. (1995). The suppression of the N-nitrosating reaction by chlorogenic acid. *Biochemical Journal*, 312(3), 947-953.
- KOSTIC, M. J. (1997). Cocoa alkalization. *Manufacturing Confectioner*, 77, 128-130.
- LECUMBERRI, E., MATEOS, R., IZQUIERDO-PULIDO, M., RUPÉREZ, P., GOYA, L., & BRAVO, L. (2007). Dietary fibre composition, antioxidant capacity and physico-chemical properties of a fibre-rich product from cocoa (*Theobroma cacao L.*). *Food Chemistry*, 104(3), 948-954.
- LÓPEZ D'SOLA, P., SANDIA, M. G., BOU RACHED, L., & HERNÁNDEZ SERRANO, P. (2012). Diseño de un programa de Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico en el proceso productivo de cacao en polvo en una industria alimentaria. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 62(4), 355-362.
- MAZOR JOLIĆ, S., RADOJČIĆ REDOVNIKVIĆ, I., MARKOVIĆ, K., IVANEC ŠIPUŠIĆ, Đ., & DELONGA, K. (2011). Changes of phenolic compounds and antioxidant capacity in cocoa beans processing. *International journal of food science & technology*, 46(9), 1793-1800.
- MILLER, K. B., HURST, W. J., PAYNE, M. J., STUART, D. A., APGAR, J., SWEIGART, D. S., & OU, B. (2008). Impact of alkalization on the antioxidant and flavanol content of commercial cocoa powders. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(18), 8527-8533.
- MINIFIE, B. (2012). Chocolate, cocoa and confectionery: science and technology. *Springer Science & Business Media*.
- NAZARIO, O., ORDOÑEZ, E., MANDUJANO, Y., ARÉVALO, J. (2014) Polifenoles totales, antocianinas, capacidad antioxidante de granos secos y análisis sensorial de licor de cacao (*Theobroma cacao L.*) criollo y siete clones. *Investigación y Amazonía*; 3 (1), 51-59
- NAZARUDDIN, R., SENG, L. K., HASSAN, O., & SAID, M. (2006). Effect of pulp preconditioning on the content of polyphenols in cocoa beans (*Theobroma cacao*) during fermentation. *Industrial Crops and Products*, 24(1), 87-94.
- OTHMAN, A., ISMAIL, A., GHANI, N. A., & ADENAN, I. (2007). Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chemistry*, 100(4), 1523-1530.
- OTHMAN, A., JALIL, A. M. M., WENG, K. K., ISMAIL, A., GHANI, N. A., & ADENAN, I. (2010). Epicatechin content and antioxidant capacity of cocoa beans from four different countries. *African Journal of Biotechnology*, 9(7), 1052-1059.
- PADILLA, F. C., RINCÓN, A. M., & BOU-RACHED, L. (2008). Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de varias semillas y nueces. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 58(3), 303-308.
- PAYNE, M. J., HURST, W. J., MILLER, K. B., RANK, C., & STUART, D. A. (2010). Impact of fermentation, drying, roasting, and Dutch processing on epicatechin and catechin content of cacao beans and cocoa ingredients. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(19), 10518-10527.
- PEREA-VILLAMIL, J. A., CADENA-CALA, T., & HERRERA-ARDILA, J. (2009). El cacao y sus productos como fuente de antioxidantes: Efecto del procesamiento. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, 41(2), 128-134.

- SULISTYOWATI, M., & MISNAWI, J. (2008). Effects of alkali concentration and conching temperature on antioxidant activity and physical properties of chocolate. *International Food Research Journal*, 15(3), 297-304.
- TOMÁS-BARBERÁN, F. A. (2003). Los polifenoles de los alimentos y la salud. *Alimentación Nutrición y Salud*, 10(2), 41-53.
- WOLLGAST, J., & ANKLAM, E. (2000). Review on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*, 33(6), 423-447.
- ZAHOULI, G. I. B., GUEHI, S. T., FAE, A. M., BAN-KOFFI, L., & NEMLIN, J. G. (2010). Effect of drying methods on the chemical quality traits of cocoa raw material. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 2(4), 184-190.